

Caracterização da composição química da biomassa da microalga *Chlamydomonas biconvexa* cultivada em efluente da indústria de óleo de palma

Dágon Manoel Ribeiro¹, Rodrigo Carvalho do Nascimento², Carolina Ribeiro Cereijo³, Hugo Santana⁴, Lorena Costa Garcia⁵, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil⁶

Resumo

A indústria global de óleo de palma produz mais de 54 milhões de toneladas de óleo anualmente, gerando cerca de 135 milhões de toneladas de efluente, o qual causa diversos danos ao ambiente. Atualmente, há perspectiva de utilização de microalgas para o tratamento de efluentes e concomitante geração de matéria-prima (biomassa) para produção de energia, alimento e bioprodutos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento e a composição da microalga *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40, cultivada em efluente de lagoa de estabilização da indústria de óleo de palma (ELE-POME). Os teores das frações proteica, lipídica e cinzas também foram determinados juntamente com o perfil de ácidos graxos e carboidratos, permitindo a avaliação de diferentes aplicações biotecnológicas para a biomassa microalgal. Carboidratos correspondem à maior fração encontrada obtendo 42,53% no cultivo com BBM (5º dia) e 42,35% no cultivo com ELE-POME (10º dia).

Palavras-chave: biorremediação. Biorrefinarias. bioenergia.

Introdução

A palma de óleo é uma das mais promissoras matérias primas para a produção mundial de biodiesel (YASIN et al., 2017). Atualmente, a produção mundial de óleo de palma ultrapassa 54 milhões de toneladas anuais (FAOSTATS, 2014). A maior parte é produzida na Indonésia e na Malásia, movimentando mais de 35 bilhões de dólares em todo o mundo (CENTER FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT AT HARVARD UNIVERSITY, 2014).

A cada tonelada de óleo de palma produzido, são geradas 2,5 toneladas de efluente do moinho de óleo de palma (POME: *Palm Oil Mill Effluent*), o que acarreta

¹ Biotecnologista, doutorando em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade de Brasília, dagon.ribeiro@colaborador.embrapa.br

² Engenheiro bioquímico, Mestre em Biotecnologia, rodrigo.nascimento@colaborador.embrapa.br

³ Bióloga, doutoranda em Tecnologias Químicas de Biológicas, Universidade de Brasília, carolina.cereijo@colaborador.embrapa.br

⁴ Biotecnologista, doutorando em Tecnologias Químicas de Biológicas, Universidade de Brasília, hugo.santana@colaborador.embrapa.br

⁵ Engenheira de alimentos, doutora em Engenharia de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, lorena.garcia@embrapa.br

⁶ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia), pesquisador da Embrapa Agroenergia, bruno.brasil@embrapa.br

um passivo ambiental que deve ser manejado. Uma das alternativas para o tratamento desse resíduo é o seu aproveitamento como substrato para o cultivo de microalgas para a produção de bioenergia e bioprodutos (AHMED et al., 2015). Exemplos são as cepas de microalgas *Clamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40 e *Tetranephris* sp. Embrapa|LBA52 que foram prospectadas a partir da coleção de microorganismos e microalgas aplicados a agroenergia e biorrefinarias da Embrapa. Essas microalgas podem promover a biorremediação do POME quando consorciadas ao uso de sistemas de lagoas de estabilização (BRASIL et al. 2016; CEREJO, 2016; NASCIMENTO, 2016; KAMYAB et al., 2016).

Este trabalho tem como objetivo determinar a composição da biomassa da cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 cultivada em efluentes de lagoas de estabilização da indústria de óleo de palma (ELE-POME) de modo a avaliar o seu potencial aproveitamento como matéria-prima para produção de compostos químicos, biocombustíveis, materiais renováveis e alimentos.

Materias e Métodos

O experimento foi realizado no laboratório de biotecnologia de algas (LBA) da Embrapa Agroenergia. A microalga utilizada foi a cepa de *C. biconvexa* Embrapa|LBA40, isolada e identificada por Hadi e colaboradores (2016), cultivada em fotobiorreatores *air lift* de placas planas de acrílico de 15 L, com volume de trabalho de 13 L, aeração de 60 Lh⁻¹ e suplementação de CO₂ ajustada para 5% da vazão de ar, com fotoperíodo de 12/12 a 35.000 Lux e temperatura de 25 °C no escuro e 35 °C no claro.

Os cultivos foram realizados em bateladas independentes durante 5, 10 e 15 dias, avaliando o crescimento celular por densidade óptica (DO) a 680 nm e utilizando dois tipos de meio de cultivo o meio Bold Basal (BISCHOFF; BOLD, 1963) e o meio composto com 100% de efluente de lagoa de estabilização da indústria de óleo de palma (ELE-POME).

Ao final dos cultivos, a biomassa foi liofilizada e foram quantificados os teores de sólidos totais e cinzas segundo Wychen e Laurens (2015b) e de proteínas (metodologia de microKjeldahl (AOAC INTERNATIONAL, 1990) para a quantificação de nitrogênio e o cálculo do teor proteico, utilizando o fator de conversão de 4,75 específico para microalgas (LAURENS, 2013). O teor e as frações de carboidratos foram determinados segundo metodologia descrita por Wychen e Laurens (2015a). A fração lipídica foi obtida por Ankom XT15 pelo método de determinação do Extrato Etéreo (EE), extraído com éter de petróleo a 90 °C por 90 minutos. A caracterização do perfil de ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo gasoso (AOAC INTERNATIONAL, 2005).

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (significância de 5 %).

Resultados e Discussões

A cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 foi cultivada em fotobiorreatores de 15L, com volume de trabalho de 14 L, utilizando ELE-POME como meio de cultivo e suplementação de dióxido de carbono durante 15 dias. A Figura 1 apresenta o crescimento da cepa de *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 em ELE-POME em comparação com o meio sintético padrão, Bold Basal. É possível observar que não houve diferença significativa na tendência de crescimento durante os primeiros 15 dias de cultivo.

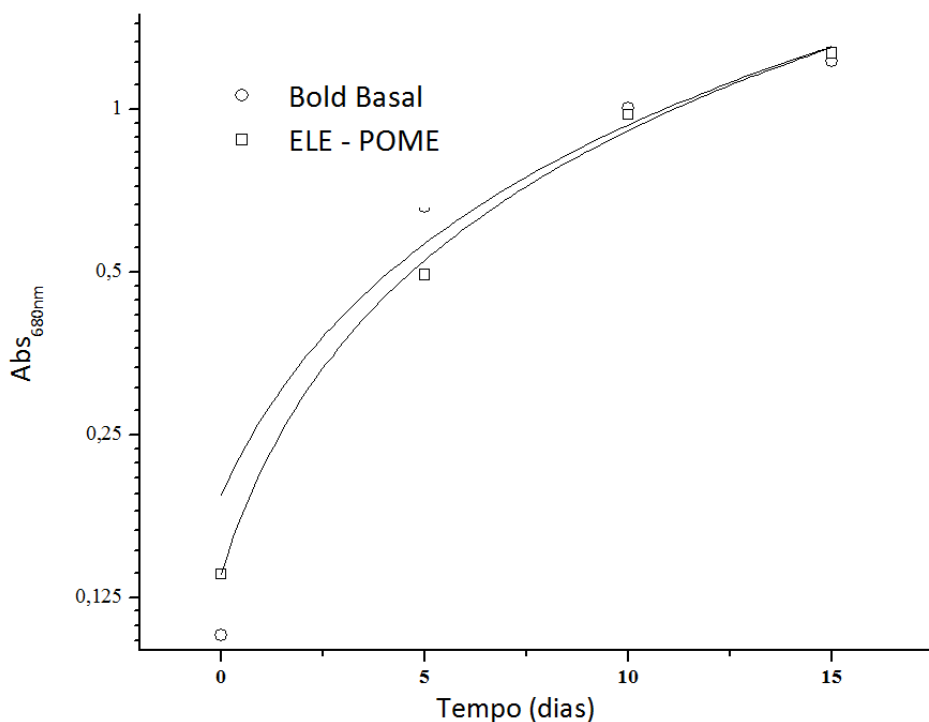


Figura 1. Crescimento *Chlamydomonas biconvexa* cultivadas em Bold Basal e ELE-POME.

Visando o aproveitamento integral da biomassa como potencial matéria-prima para biorrefinarias (BRASIL et al., 2016), as frações majoritárias da biomassa (carboidratos, lipídios, proteínas e cinzas) foram determinadas nos diferentes tempos de cultivo em meio Bold Basal e ELE-POME (Tabela 1).

É possível observar que, em todos os cultivos realizados, a maior fração foi de carboidratos atingindo até 42,53% em cultivo com Bold Basal (quinto dia), com produtividade de 81,1 mg.L⁻¹.d⁻¹, e em cultivo com ELE-POME a máxima fração de carboidratos foi 42,35% no décimo dia com produtividade de 66,1 mg.L⁻¹.d⁻¹. Uma biomassa algal com alto teor e produtividade de carboidratos pode ser destinada à produção de bioetanol (FARIAS SILVA; BERTUCCO, 2016).

Tabela 1. Teor e produtividade de biomassa, carboidratos, proteínas, lipídios e cinzas de *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 cultivadas em Bold Basal e ELE-POME de diferentes dias de coleta.

<i>Chlamydomonas biconvexa</i> Embrapa LBA40	Bold Basal			ELE - POME		
	5 dias	10 dias	15 dias	5 dias	10 dias	15 dias
Produtividade de Biomassa (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	190,6 (± 15) ^a	147,3 (± 7,5) ^b	89,5 (± 5) ^c	164,7 (± 15) ^{ab}	156 (± 1,1) ^b	104 (± 17,3) ^c
Teor de carboidratos (%)	42,53 (± 1,7) ^a	37,17 (± 1,5) ^{abc}	30,97 (± 2,4) ^c	31,96 (± 3,4) ^c	42,35 (± 4,0) ^{ab}	34,31 (± 3,8) ^{bc}
Produtividade de carboidratos (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	81,1 (± 3,3) ^a	54,7 (± 2,2) ^{bc}	27,7 (± 2,2) ^d	52,6 (± 5,6) ^c	66,1 (± 6,3) ^b	35,7 (± 4,0) ^d
Teor de proteínas (%)	21,6(± 0,12) ^b	18,9 (± 0,14) ^c	17,9 (± 0,08) ^d	26 (± 0,18) ^a	19,3 (± 0,41) ^c	19,0 (± 0,13) ^c
Produtividade de proteínas (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	41,1 (± 0,2) ^b	27,8 (± 0,21) ^d	15,7 (± 0,07) ^f	42,8 (± 0,31) ^a	30 (± 0,65) ^c	19,8 (± 0,13) ^e
Teor de lipídios (%)	12 (± 0,43) ^a	12,3 (± 0,52) ^a	6,42 (± 0,31) ^c	11,3 (± 0,8) ^{ab}	9,95 (± 0,45) ^b	6,99 (± 0,60) ^c
Produtividade de lipídios (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	22,9 (± 0,82) ^a	18 (± 0,77) ^b	5,7 (± 2,8) ^c	18,6 (± 1,3) ^b	15,5 (± 0,71) ^b	7,3 (± 0,62) ^c
Teor de Cinzas (%)	6,45 (± 0,56) ^a	4,8 (± 0,04) ^b	5,2 (± 0,12) ^b	6,68 (± 0,2) ^a	4,64 (± 0,08) ^{bc}	4,06 (± 0,18) ^c
Produtividade de Cinzas (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	12,3 (± 1,07) ^a	7,1 (± 0,07) ^c	4,6 (± 0,11) ^d	11 (± 0,33) ^b	7,2 (± 0,12) ^c	4,2 (± 0,19) ^d

*Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey aos 5% de probabilidade

Em estudos de Santana e colaboradores (2016), que realizaram cultivos de *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 nas mesmas condições (fotobiorreatores de 15 L), porém utilizando vinhaça (efluente de usinas de etanol), a maior fração observada foi de proteínas atingindo o teor de 41% da biomassa e produtividade de até 88,71 mg.L⁻¹.d⁻¹. Esses valores são superiores aos encontrados neste trabalho, que observou o maior teor (26%) e produtividade (42,8 mg.L⁻¹.d⁻¹) de proteínas em cultivos em ELEPOME após 5 dias de cultivo.

No meio ELE-POME, o teor e a produtividade de lipídios alcançou sua maior produção em 5 dias de cultivo, acumulando 11,3% e com uma produtividade de 18,6 mg.L⁻¹.d⁻¹. Diversas são as estratégias para a obtenção de maior fração lipídica, como a utilização de estresses no cultivo (MINHAS et al., 2016) ou a utilização da tecnologia do DNA recombinante e engenharia metabólica (MALLICK et al., 2016; AJJAW et al., 2017).

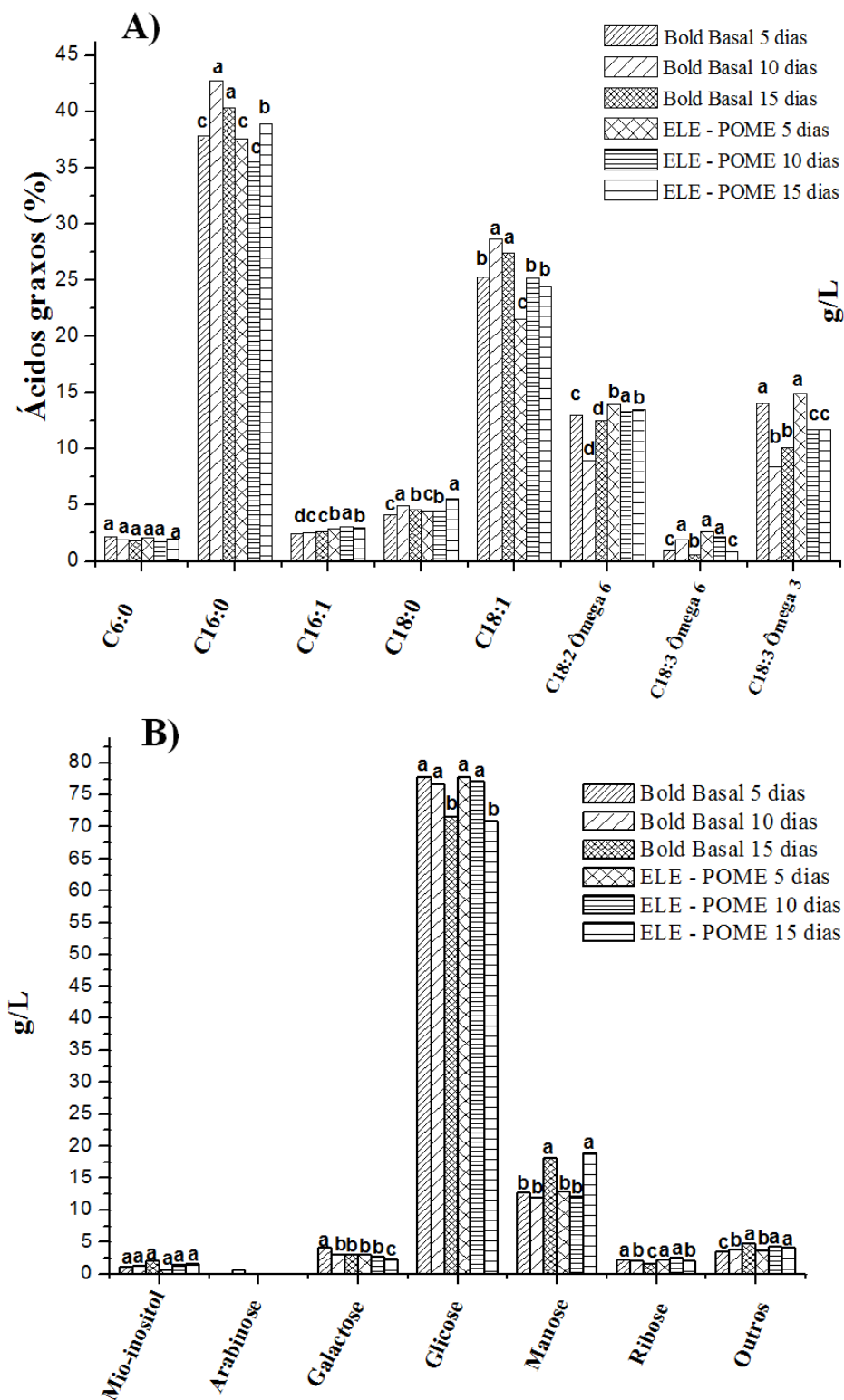


Figura 2. Caracterização do perfil de A) Ácidos Graxos e B) Carboidratos *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 cultivadas em Bold Basal e ELE-POME de diferentes dias de coleta.

*Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey aos 5% de probabilidade.

Atualmente, o objetivo de muitos pesquisadores é aperfeiçoar técnicas que possam utilizar toda biomassa. É o caso do processo de liquefação hidrotérmica, por meio da qual, com a utilização de altas temperaturas, pressão e catalizadores, é possível converter a biomassa algal em petróleo bruto (*crude oil*) (JONES et al., 2014; BARREIRO et al., 2015; HU et al., 2017).

Na Figura 2, é apresentada a caracterização do perfil de ácidos graxos e de carboidratos, informações importantes, visto que existe uma crescente busca por coprodutos de alto valor agregado para um maior ganho econômico em biorrefinaria de microalgas (CHEW et al., 2017).

Estudos da caracterização composição química da biomassa são essenciais para entender como os organismos controlam suas vias de biossíntese em resposta às condições fisiológicas e ambientais. A caracterização dos compostos das microalgas traz a possibilidade para além da futura produção de biocombustíveis de a biomassa algal vir a se tornar uma matéria-prima destinada como alimento animal ou humano e biocompostos de alto valor agregado de interesse biotecnológico (YU et al., 2011).

Existem grandes perspectivas de que os estudos com microalgas possam trazer diferentes soluções sustentáveis a problemas energéticos, alimentares e ambientais (BHUJADE et al., 2017; PIRES, 2017). E especialmente no Brasil, que já foi relatado por diversos autores como um dos países no mundo que tem maior possibilidade de implantação das biorrefinarias de microalgas, pela disponibilidade de áreas, altas incidências luminosas, temperatura tropical e a possibilidade de integrar a produção de microalgas em agroindústrias já existentes como usinas sucroalcooleiras, usinas petroquímicas e indústrias de óleo de palma (MOODY, et al., 2014; SASONGKO; NOGUCHI, 2015; BRASIL et al., 2016).

Conclusão

Mostrou-se promissora a utilização do cultivo de microalgas em efluente da indústria de óleo de palma tanto para biorremediação do efluente, em que foi relatada uma remoção significativa de nitrogênio e fósforo (NASCIMENTO, 2016), quanto para a produção de biomassa algal. Os carboidratos foram os compostos majoritários dentre as frações analisadas, atingindo até 42,53% no cultivo com BBM (5º dia) e 42,35% no cultivo com ELE-POME (10º dia). Os teores de proteínas, lipídios, cinzas, perfil de ácidos graxos e carboidratos foram estudados mostrando que a microalga *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40 é uma excelente opção para integração da produção e biorrefinaria de biomassa microalgal com a indústria de óleo de palma no Brasil. Análises toxicológicas são necessárias para a destinação da biomassa algal para uso alimentício.

Referências

- AHMED, Y.; YAAKOB, Z.; AKHTAR, P.; SOPIAN, K. Production of biogas and performance evaluation of existing treatment processes in palm oil mill effluent (POME). **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1260–1278, 2015.
- AJJAW, I.; VERRUTO, J.; AQUI, MO.; SORIAGA, L. B.; COPPERSMITH, J.; KWOK, K.; PEACH L.; ORCHARD, E.; KALB, R.; XU, W.; CARLSON, T. J.; FRANCIS, K.; KONIGSFELD K.; BARTALIS, J.; SCHULTZ, A.; LAMBERT, W.;

SCHWARTZ, A. S.; BROWN, R.; MOELLERING, E. R. Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 7, p. 647+, 2017.

AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of AOAC International**. 11th ed. Maryland, 1990.

AOAC INTERNATIONAL. **Official Procedure. Approved Procedure Ce 1-62 - Fatty Acid Composition by gas chromatography**. Illinois: American Oil Chemists Society, 2005.

AOCS. **Official Procedure. Approved Procedure Ce 2-66 - Preparation of methyl esters of fatty acids**. Illinois: American Oil Chemists Society, 2005.

BARREIRO, D. L.; RIEDE, S.; HORNUNG, U.; KRUSE, A.; PRINS W. Hydrothermal liquefaction of microalgae: Effect on the product yields of the addition of an organic solvent to separate the aqueous phase and the biocrude oil. **Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts**, v. 12, p. 206-212, 2015.

BHUJADE, R.; CHIDAMBARAM, M.; KUMAR, A.; SAPRE, A. Algae to Economically Viable Low-Carbon-Footprint Oil. **The Annual Review of Chemical and Biomolecular**, v. 8 p. 335-357, 2017.

BISCHOFF, H. W.; BOLD, H. C. **Some soil algae from enchanted rock and related algal species**. Austin: University of Texas Publications, 1963. 95 p.

BRASIL, B. S. A. F.; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA F. G. Microalgae biorefineries: the brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, n. 16, p. 32271-32273, 2016.

CENTER FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT AT HARVARD UNIVERSITY. **The Atlas of Economic Complexity**. 2014. Disponível em: <http://atlas.cid.harvard.edu/explore/tree_map/export/show/all/1511/2014/>. Acesso em: jun. 2017.

CHEW, K. W.; YAPA, J. Y.; SHOW, P. L.; SUANC, N. H.; JUAN, J. C.; LING, T. C.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Microalgae biorefinery: high value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53-62, 2017.

CEREIJO, C. R. **Seleção e cultivo de microalgas em efluentes de agroindústrias de palma-de-óleo e mandioca**. 2016. 51 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, TO. Orientador: Félix Gonçalves de Siqueira.

FARIAS SILVA, C. E. de; BERTUCCO A. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: a review and technological outlook. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 11, p. 1833-1842, 2016.

FAOSTAT. **Food and agriculture data**. 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat>>. Acesso em: jun. 2017.

HADI, S. I. I. A.; SANTANA, H.; BRUNALE, P. P. M.; GOMES, T. G.; OLIVEIRA M. D.; MATTHIENSEN A.; OLIVEIRA, M. E. C.; SILVA, F. C. P.; BRASIL, B. S. A. F. DNA Barcoding Green Microalgae Isolated from Neotropical Inland Waters. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, artigo e0149284, 2016.

HU, Y.; FENG, S.; XU, C.; BASSI, A. Production of low-nitrogen bio-crude oils from microalgae pre-treated with pre-cooled NaOH/urea solution. **Fuel**, v. 206, p. 300-306, 2017.

JONES, S. B.; ZHU, Y.; ANDERSON, D. B.; HALLEN, R. T.; ELLIOTT, D. C.; SCHMIDT, A. J.; ALBRECHT, K. O.; HART, T. R.; BUTCHER, M. G.; DRENNAN, C.; SNOWDEN-SWAN, L. J.; DAVIS, R.; KINCHIN, C. **Process design and economics for the conversion of algal biomass to hydrocarbons: whole algae hydrothermal liquefaction and upgrading**. Washington, DC: Pacific Northwest National Laboratory, 2014. PNNL-23227.

KAMYAB, H.; DIN, M. F. M.; PONRAJ, M.; KEYVANFAR, A., REZANIA, S; TAIB, S. M.; MAJID, M. Z. A. Isolation and screening of microalgae from agro-industrial wastewater (POME) for biomass and biodiesel sources. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 60, p. 29118-29125, 2016.

LAURENS, L. M. L. **Summative mass analysis of algal biomass: integration of analytical procedures**. Golden: The National Renewable Energy Laboratory, 2013.

MALLICK, N.; BAGCHI, S. K.; KOLEY, S.; SINGH, A. K. Progress and challenges in microalgal biodiesel production. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, artigo 79, 2016.

MINHAS, A. K.; HODGSON, P.; BARROW, C. J.; ADHOLEYA A. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, artigo 546, 2016.

MOODY, J. W.; MCGINTY, C. M.; QUINN, J. C. Global evaluation of biofuel potential from microalgae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 23, p. 8691-8696, 2014.

NASCIMENTO R. C. **Cultivo de microalgas em fotobiorreatores de placas planas para a produção de biomassa e biorremediação de efluente da agroindústria de óleo de palma**. 2016. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, TO. Orientador: Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil.

PIRES, J. C. M. COP21: The algae opportunity? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 867-877, 2017.

SANTANA, H.; CEREIJO, C. R.; TELES, V. C.; NASCIMENTO, R. C.; FERNANDES, M. S.; BRUNALE, P.; CAMPANHA, R. C.; SOARES, I. P.; SILVA, F. C. P.; SABAINI, P. S.; SIQUEIRA, F. G.; BRASIL, B. S. A. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 133-140, 2016.

SASONGKO, N. A.; NOGUCHI, R. Comprehensive evaluation of integrated energy plantation model of palm oil and microalgae based biofuel for sustainable energy production. In: BAKAR, R. B. A.; FROOME, C. (Ed.). **Sustainable energy for green mobility**. Amsterdam: Elsevier, 2015. p. 226-235. (Energy Procedia, v. 68).

WYCHEN, S. van; LAURENS, L. M. L. **Determination of total carbohydrates in algal biomass**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2015a. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/fy16osti/60957.pdf>>. Acesso em: jun. 2016.

WYCHEN, S. van; LAURENS, L. M. L. **Determination of total solids and ash in algal biomass**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2015b. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/fy16osti/60956.pdf>>. Acesso em: jun. 2016.

YASIN, M. H. M.; MAMAT R.; NAJAFIC. G.; ALI, O. M.; YUSOP, A. F.; ALI, M. H. Potentials of palm oil as new feedstock oil for a global alternative fuel: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 1034-1049, 2017.

YU, W. L.; ANSARI, W.; SCHOEPP, N. G.; HANNON, M. J.; MAYFIELD, S. P.; BURKART, M. D. Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol production in microalgae. **Microbial Cell Factories**, London, v. 10, artigo 91, 2011.